

Drogenscreening im Serum mittels immunchemischer Verfahren (FPIA)

K. Schmidt¹, G. Kauert¹ und R. Zinck²

¹ *Institut für Forensische Toxikologie, Zentrum der Rechtsmedizin J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main*

² *Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden-Delkenheim*

1. Einleitung

Screening – Untersuchungen im Urin auf Betäubungsmittel oder andere toxikologisch relevante Substanzen mittels immunchemischer Verfahren sind seit vielen Jahren routinemäßig eingesetzte, erprobte Verfahren [1]. Solche Vortests sind in der Regel mit ausreichender Empfindlichkeit geeignet, die Vielzahl der anfallenden Urinuntersuchungen in negative und potentiell positive Proben vorzuselektieren. Diese Tests sind in erster Linie für die Matrix Urin konzipiert. In den letzten Jahren und insbesondere nach in Kraft treten des § 24a Abs. 2 StVG [2] gewinnt jedoch in der toxikologischen Analytik die Vorselektion von Serumproben vor der gezielten quantitativen chromatographischen Bestimmung eine steigende Bedeutung.

Erst die quantitative Bestimmung eines pharmakologisch wirksamen Analyten im Blut/Serum ergibt eine eindeutige Aussage darüber, ob ein Delinquent tatzeitrelevant unter der Einwirkung eines Betäubungsmittels oder Arzneistoffes gestanden hat und somit eine Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit oder Einschränkung der Schuldfähigkeit in Betracht gezogen werden kann.

Quantitative, in der Regel gaschromatographisch-massenspektrometrische oder hochleistungsflüssigkeitschromatographische Untersuchungen von Blutproben sind zeit-, personal- und kostenaufwendig. Somit ist es ökonomisch erstrebenswert, analytisch zuverlässige Auswahlverfahren zu finden, mit Hilfe derer kostengünstig und schnell ein Vorergebnis zu erhalten ist. Nach positivem und negativem Befund können dann die positiven einer differenzierenden und quantitativen Analyse zugeführt werden. Hierzu bieten sich die immunchemischen Verfahren wie oben dargelegt an. Problematisch hierbei ist, dass es sich bei Urin um ein rein wässriges Medium handelt und bei Blut-/Serumproben um stark eiweißhaltige Matrix. Um solche Urintests auch für die Bestimmung von Blut-/Serumproben anzuwenden, wurden entsprechende aufwendige Probenaufbereitungsverfahren (Eiweißfällung mittels Aceton, Methanol Perchlorsäure u.a.) entwickelt, um die Probe Blut/Serum in einen wässrigen, mittels Urintest messbaren Extrakt zu überführen [3,4,5]. Diese Verfahren sind einerseits arbeitsintensiv und führen andererseits teilweise aufgrund von Verdünnungen oder Analytverlusten zu nicht ausreichender Messempfindlichkeit.

Die Entscheidung, ob ein immunchemischer Meßwert als positiv oder negativ zu bewerten ist, wird durch den vom Hersteller festgesetzten cut-off-Wert (Schwellenwert) getroffen. Der cut-off liegt oberhalb der Meßempfindlichkeit des Verfahrens und orientiert sich häufig an den von NIDA vorgegebenen Grenzwerten.

Für die Untersuchung von Blut-/Serumproben mit den Urin-Kits stehen jedoch keine vom Hersteller der Tests empfohlenen cut-off-Werte zur Verfügung. Dies wird verständlich, da unspezifische Untergrundmessungen und die Empfindlichkeit einer Messung von dem jeweils angewendeten Arbeitsverfahren und dem Meßsystem abhängig sind. Andererseits liegen wenig Erfahrungen in Bezug auf Durchführbarkeit, cut-off-Werte und Meßempfindlichkeit bei einer Direktmessung des Serums mit den Urin-Kits vor. Deshalb wurde von uns die Anwendbarkeit der für das ABBOTT-AxSym-System zur Verfügung stehenden Urin-Kits für Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Cannabinoide, Kokain, Methadon und Opiate für die Matrix Serum ohne Eiweißfällung überprüft, deren Ergebnisse hier beschrieben werden.

In Analogie zu dem Urin-Screening war es erforderlich, dass primär für jeden Analyten die unspezifische Messung ermittelt wird. Nach statistischer Aufbereitung der Einzelwerte konnte somit empirisch ein cut-off-Wert erhalten werden, der als „Analyt-Äquivalente“ angegeben wird.

Die Nachweisempfindlichkeit einer solchen Methodik ist einerseits abhängig von der Empfindlichkeit des jeweiligen Tests und der unspezifischen Untergrundmessung. Die Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit muss durch Messung dotierter drogen- und medikamentenfreier Seren erfolgen.

Um die in der Serum-Direkt-Messung erhaltenen Ergebnisse beurteilen zu können, wird diese mit der bereits schon längerfristig routinemäßig angewendeten Acetonfällung verglichen. Die Bestätigungsanalysen erfolgen mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer bzw. hochleistungsflüssigkeitschromatographischer (HPLC) Verfahren.

2. Material und Methoden

2.1 Acetonfällung

In 2 ml verschließbare Eppendorfgeläße werden 0,5 ml Aceton vorgelegt und 0,5 ml Serum oder Blut langsam eingetropt. Der Ansatz wird 60 Sekunden bei maximaler Rüttelgeschwindigkeit gevortext und anschließend 10 Minuten bei 13.000 RpM in der Heraeus-Biofuge pico zentrifugiert. Der Überstand wird sofort in AxSym-Probengefäße abdekandiert und unter den werksseitig angegebenen Bedingungen im ABBOTT-AxSym-Meßgerät auf Drogen mittels der Urin-Kits untersucht.

2.2 Direkt-Messung

0,5 ml Serum werden 10 Minuten bei 13.000 RpM in der Heraeus-Biofuge pico zentrifugiert und der Überstand sofort in AxSym-Probengefäße abgegossen und wie oben beschrieben untersucht.

3. Ergebnisse:

3.1 Untergrundmessungen und Cut-off-Werte

Zur Ermittlung der unspezifischen Untergrundwerte wurden für jeden Analyten jeweils 40 medikamenten- und drogenfreie Seren sowohl direkt als auch nach Acetonfällung gemessen. Die Ergebnisse der Einzelmessungen und die statistischen Auswertungen sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Serum-Leerwerte nach Acetonfällung. Mittelwerte, Standardabweichung und Cut-Off. Cut-Off in Analogie zu den Cut-Off-Werten der Urintests [1].

Analyt	Amph.	Barb.	Benzo.	Cann.	Cocain	Methad.	Opiate
Einheit	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
MW	20	112	71	8	12	22	21
STABW	13	19	18	5	6	11	7
Cut-Off	20	112	71	8	12	22	21

Tabelle 2: Serum-Leerwerte ohne Fällung (Direktmessung). Mittelwerte, Standardabweichung und Cut-Off. Cut-Off in Analogie zu den Cut-Off-Werten der Urintests [1].

Analyt	Amph.	Barb.	Benzo.	Cann.	Cocain	Methad.	Opiate
Einheit	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
MW	0	43	0	0	0,1	16	33
STABW	0	48	0	0	0	13	12
Cut-Off	0	43	0	0	1	16	33

Die immunchemischen Messungen mit den Urin-Kits ergaben, dass bei allen Analyten in der Acetonfällung, teils auch bei der Direktmessung, mit unterschiedlicher Intensität ein „unspezifischer“ nicht auf der Anwesenheit eines Analyten beruhender Meßwert vorliegt. Diese so erhaltenen Meßwerte, die als Analyt-Äquivalente in ng/ml angegeben sind, werden als cut-off-Werte eingesetzt, analog dem cut-off-Wert bei den Urinuntersuchungen [1]. Ein Serum wird dann einer quantitativen GC-MS- oder HPLC-Analyse zugeführt, wenn der immunchemische Meßwert gleich oder größer dem empirisch ermittelten cut-off-Wert gemessen wird. In der Routine-Analytik wird in jeder Meßserie zur Kontrolle der cut-off-Werte jeweils ein medikamenten- und drogenfreies Poolserum mit untersucht.

3.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen mit der Direktmessung

Nach Festlegung der analytspezifischen cut-off-Werte wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenzen mit der Direktmessung medikamenten- und drogenfreie Poolseren mit absteigenden Konzentrationen der Analyten und zwar jeweils mit Ausnahme der Cannabinoide mit 1.000, 500, 400, 250, 200, 100, 50, 25 und 10 ng/ml dotiert, gemischt und wie unter der Methode Direktmessung beschrieben mittels des AxSym-Systems vermessen.

Bei den Cannabinoiden, Tetrahydrocannabinol (THC), Hydroxy-THC und THC-carbonsäure erfolgten die Dotierungen jeweils in den Konzentrationen 1.000, 100, 75, 50, 25, 15 und 10 ng/ml Serum.

Unter Zugrundelegung der in Tabelle 2 festgesetzten cut-off-Werte und unter Berücksichtigung der errechneten Standardabweichungen sowie den erhaltenen Meßwerten der dotierten Seren wurden die in der Tabelle 3 aufgeführten Nachweisgrenzen ermittelt. Die mit THC, Hydroxy-THC und THC-carbonsäure dotierten Seren ergaben bei keiner Konzentration ein Meßsignal.

Tabelle 3: Nachweisgrenze im Serum ohne Probenvorbereitung (Direktmessung) unter Anwendung der Urintests und des AxSYM-Meßgerätes.

Analyt	Nachweisgrenze in ng/ml	Analyt	Nachweisgrenze in ng/ml
Amphetamin	100 - 200	7-Aminoflunitrazepam	ca. 1000
Methamphetamin	100 - 200	Cocain	nicht messbar
MDMA	200	Methylecgonin	nicht messbar
MDEA	100 - 250	Benzoylecgonin	50 – 100
MDA	200	DL-Methadon	20 – 50
Pentobarbital	50 - 100	Levomethadon	50
Methohexital	nicht messbar	Morphin	25 – 50
Phenobarbital	100	Morphin-3-glucuronid	100 – 200
Diazepam	200	Codein	25 - 50
Nordazepam	200	Dihydrocodein	50 - 100
Flunitrazepam	400		

3.3 Untersuchungen zum praxisrelevanten Einsatz der Direktmessung bei authentischen Blutproben auffällig gewordener Verkehrsteilnehmer

Im Rahmen der Begutachtung auffällig gewordener Verkehrsteilnehmer ist die quantitative Untersuchung einer Blut-/Serumprobe erforderlich. Im Hinblick auf diese Untersuchungen und insbesondere in Bezug auf die Erfordernisse des § 24a Abs. 2 StVG sind die ermittelten Nachweisgrenzen der Analyte nicht ausreichend für eine Vorselektion in potentiell positiver oder negativer Proben. Um die Einsatzmöglichkeit der Direktmessung dennoch für diesen Untersuchungszweck bewerten zu können, wurde die bereits routinemäßig eingesetzte Acetonfällung mit den Ergebnissen der Direktmessung verglichen. Als Kriterium für die Durchführung einer qualitativen und quantitativen gaschromatographisch-massenspektrometrischen oder hochleistungs-flüssigkeitschromatographischen Bestätigungsanalyse war der positive immun-chemische Befund, der mit der Acetonfällung erhalten wurde, ausschlaggebend. Als cut-off-Werte wurden die in Tabelle 1 gemessenen und berechneten Werte zugrunde gelegt. Der Vergleich beider Methoden zeigt, wie dies in der Diskussion noch zahlenmässig dargestellt wird, dass bei alleinigem Einsatz der Direkt-Messung als Ausschlusskriterium für die Durchführung einer quantitativen Bestimmung eine grosse Anzahl an Proben nicht untersucht worden wäre und somit ein „falsch-negatives“ Ergebnis vorgelegen hätte. Die Cannabinoide sind mittels Direkt-Messung in den Seren nicht erfassbar.

Diese diskrepanten Befunde wurden aufgrund gaschromatographisch-massenspektrometrischen oder hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Bestätigungsanalysen erhalten. Die Ergebnisse der Bestätigungsanalysen sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich zwischen Acetonfällung, Direktmessung und GC-MS/HPLC-Analysen. Der positive Befund der Acetonfällung war das Kriterium für die weiterführende Analytik.

Substanzgruppe	Gesamt-zahl	Acetonfällung IC-positiv		GC-MS bestätigt		Bestätigt/ Gesamt-zahl	Direktmessung IC-positiv		GC-MS bestätigt		Bestätigt/ Gesamt-zahl
		Anzahl	%	Anzahl	%		Anzahl	%	Anzahl	%	
Methadon	115	20	17	19	95	16,5	45	39	20	44	17,4
Opiate	140	40	29	38	95	27,1	92	66	42	46	30,0
Amphetamine	132	44	33	39	89	29,5	24	18	22	92	16,6
Cocain	113	58	51	47	81	41,5	46	41	43	93	38
Benzodiazepine	113	47	42	30	64	26,5	28	25	28	100	24,8

4. Diskussion

In der hier dargestellten Studie wurde versucht, ohne vorherige Probenaufbereitung unter Anwendung der Urin-Tests und dem ABBOT AxSym-Meßgerät Methadon, Opiate, Amphetamin-Derivate, Kokain, Benzodiazepine und Cannabinoide zu messen. In Analogie zu den Urin cut-off-Werten wurden für jede Analytgruppe durch Messung von jeweils 40 medikamenten- und drogenfreien Seren entsprechende cut-off-Werte ermittelt, die als Analyt-Äquivalente (ng/ml) angegeben wurden. Analog hierzu wurden auch die cut-off-Werte nach Acetonfällung des Serums bestimmt (Tabelle 1). Bei der Direkt-Messung des Serums lagen die unspezifischen Messungen im Verhältnis zur Acetonfällung relativ niedrig (Tabelle 2).

Zur Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit wurden medikamenten- und drogenfreie Seren mit unterschiedlichen Konzentrationen an Analyten dotiert und direkt vermessen (Tabelle 3).

Mit Ausnahme der Cannabinoide können bei der Direkt-Messung alle relevanten Betäubungsmittel mit den zur Verfügung stehenden Urin-Kits und dem AxSym-Messsystem beim Vorliegen relativ hoher Konzentrationen (z. B. Intoxikation) erfasst werden. Niedrigere Konzentrationen, wie sie auch bei verkehrsmedizinischen Fragestellungen oder bei Untersuchungen im Rahmen des § 24a Abs.2 StVG vorliegen können, werden mit der Direkt-Messung nicht zuverlässig erfasst, hierzu ist eine Probenvorbereitung mittels Acetonfällung erforderlich. Vergleicht man die positiven immunochemischen Ergebnisse der Acetonfällung mit der Direkt-Messung im Hinblick auf die Entscheidung zu einer erforderlichen quantitativen Bestimmung, so wären Amphetamine in 32,6 %, Kokain und Metabolite in 22,6 %, Methadon in 4,7 % und Benzodiazepine in 27,4 % der Fälle nicht einer weiteren Untersuchung zugeführt worden und hätten somit möglicherweise als „falsch-negative“ Befunde vorgelegen. Bei den Opiaten ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Acetonfällung und der Direkt-Messung, die **Cannabinoide** sind mit der Direkt-Messung in keinem Konzentrationsbereich erfassbar.

Das entscheidende Bewertungskriterium für beide Methoden ist die gaschromatographisch-massenspektrometrische bzw. hochleistungsflüssigkeitschromatographische Bestätigungsanalyse.

Auf den Analyten **Methadon** wurde in 115 Serumproben geprüft. Die Acetonfällung ergab 20 (17 %) positive Proben, von denen 19 (95 %) bestätigt werden. Bezogen auf die Gesamtzahl der Untersuchungen entspricht dies, dass 16,5 % der Seren Methadon enthielten. Im gleichen Untersuchungsgut fielen mit der Direkt-Messung 45 (39 %) positive Proben an, von denen 20 (44 %) bestätigt wurden. Bezogen auf die Gesamtzahl der Untersuchungen entspricht dies einem bestätigtem Methadon-Nachweis von 17,4 %. Aus der Vorselektion der Serumproben mit der Direkt-Messung resultiert zwar für Methadon eine geringgradig höhere Trefferquote, jedoch dies auf Kosten einer erheblichen Anzahl an primär „falsch-positiven“ Ergebnissen (56 %), so dass die zwangsweise nachfolgenden GC-MS-Untersuchungen einen erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand erfordern.

Für die **Opiate** ergaben sich in 140 untersuchten Proben mit der Acetonfällung 40 (29 %) positive Befunde, von denen wiederum 38 (95 %) bestätigt wurden. Die Direkt-Messung führte zu 92 (66 %) positiven Ergebnissen, von denen 42 (46 %) bestätigt wurden. Beurteilt man die Ergebnisse unter Einbeziehung der Gesamtzahl der für die Opiate durchgeführten Untersuchungen, so wurden nach Vorselektion mit der Acetonfällung 27,1 % und bei der Direkt-Messung 30 % opiathaltige (Morphin, Codein, Dihydrocodein) Serumproben erkannt. Auch bei der Direkt-Messung der Opiate liegt eine höhere Trefferquote vor, jedoch auch auf Kosten eines erheblich höheren Messaufwandes.

Auf **Amphetamin-Derivate** wurde in 132 Proben untersucht. Die Acetonfällung ergab 44 (33 %) positive Ergebnisse, von denen 39 (89 %) bestätigt wurden, während mit der Direkt-Messung 24 (18 %) positive Proben vorlagen mit einer Bestätigung von 22 (92 %). Bezogen auf die Gesamtzahl der Untersuchungen wurden mittels der Acetonfällung 29,5 % und der Direkt-Messung nur 16,6 % der Amphetamin-Derivate (Amphetamin, MDA, MDMA, MDEA) im Serum nachgewiesen. Die um 12,9 % niedrigere Trefferquote mittels der Direktmessung resultiert auf der schlechten Nachweisgrenze der Amphetamin-Derivate, die mit 100 bis 200 ng/ml bestimmt wurde, so dass darunter liegende Konzentrationen nicht erfasst werden.

In 113 Serumproben wurde auf **Kokain und Metabolite** untersucht. Die Acetonfällung war in 58 (51 %) Proben positiv, von denen 47 (81 %) bestätigt wurden. Bei der Direkt-Messung konnten primär 46 (41 %) positive Befunde erhalten werden, von denen 43 (93 %) bestätigt wurden. Unter Berücksichtigung der Gesamtzahl der Untersuchungen von 113 Proben wurden mit der Acetonfällung 41,5 % Kokainkonsumenten erkannt und mit der Direktmessung

38,0 %. Die um 3,5 % niedrigere Nachweisquote mit der Direkt-Messung wird durch die Nachweisgrenze erklärbar, die für das Benzoyllecgonin mit 50 – 100 ng/ml bestimmt wurde. Der Anteil der „falsch-positiven“ Befunde ist bei der Direkt-Messung um 12 % geringer, so dass hier weniger aufwendige GC-MS-Untersuchungen anfallen.

Die **Benzodiazepine** wurden in 113 Serumproben untersucht. Hier ergab die Acetonfällung 47 (42 %) positive Ergebnisse, von denen 30 (64 %) bestätigt wurden. In der Direkt-Messung lagen primär nur 28 (25 %) positive Befunde vor, von denen jedoch 28 (100 %) bestätigt wurden. Diese hohe Bestätigungsrate resultiert daraus, dass die Benzodiazepine nur relativ unempfindlich erfasst werden. Das in Deutschland häufig mißbräuchlich in der Drogenszene angewendete Flunitrazepam und dessen typischer Metabolit 7-Aminoflunitrazepam werden durch diese Vorprobe nicht erfasst.

Die relativ niedrige Bestätigungsrate bei der Acetonfällung von nur 64 % ergibt sich daraus, dass hier der cut-off-Wert sehr niedrig angesetzt wurde, um auch möglicherweise niedrig dosierte Benzodiazepine und solche mit geringer Kreuzreaktivität zu erfassen. Bezogen auf die Gesamtzahl der 113 untersuchten Serumproben auf Benzodiazepine wurden mit der Acetonfällung 26,5 % und mit der Direkt-Messung 24,8 % Benzodiazepinkonsumenten erkannt. Die um 1,7 % niedrigere Nachweisquote bei der Direkt-Messung wird dadurch erklärbar, dass Benzodiazepinkonzentrationen unter 200 ng/ml nicht erfasst werden.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Direkt-Messung von Serumproben für die Analytgruppen Methadon, Opiate, Amphetamin-Derivate, Kokain und Benzodiazepine möglich ist, insbesondere dann, wenn, wie bei Intoxikationen, höhere Analytkonzentrationen zu erwarten sind. Im Rahmen verkehrsmedizinischer Untersuchungen muß mit Ausnahme des Methadons und der Opiate damit gerechnet werden, dass Amphetamin-Derivate, Kokain und Metabolite sowie Benzodiazepine nicht mit ausreichender Empfindlichkeit erkannt werden.

Literatur

- (1) H. Schütz: Screening von Drogen und Arzneimitteln mit Immunoassays: 3., erweiterte, überarbeitete Auflage, Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH, Wiesbaden (1999)
- (2) Deutscher Bundestag (1998): Gesetz zur Änderung des Straßenverkehrsgesetzes, Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998 Teil I Nr.25: 810
- (3) M. Bogusz, R. Aderjan, G. Schmitt, E. Nadler Und B.Neureither: The determination of drugs of abuse in whole blood by means of FPIA and EMIT-dau immunoassays- a comparative study, Forensic Sci Int 48:27- 37 (1990)
- (4) M. Bogusz, G. Schmitt, M. Wu, R. Aderjan: Anwendung des FPIA (Abbott TDX) für Blutuntersuchungen auf Btm - Bericht nach einjähriger Erfahrung, Zentralblatt Rechtsmedizin 34, 421 (1990)
- (5) J. Becker, A. Correll, W. Koepf, C. Rittner: Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Benzodiazepinen mittels Immunoassays (FPIA) im Serum und Vollblut, Zentralblatt Rechtsmedizin 34, 422, (1990)